

Darstellung der Erythrozytenmembran
mit der Gefrierätztechnik.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an
Erythrozyten und Erythrozytenschatten, nach
hypotoner Hämolyse und nach Saponineinwirkung

Dorothee von Weizsäcker

1970

Aus dem Institut für Hämatologie der GSF, Assoziation mit EURATOM, München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

Darstellung der Erythrozytenmembran mit der Gefrierätztechnik.
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Erythrozyten
und Erythrozytenschatten, nach hypotoner Hämolyse
und nach Saponineinwirkung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dorothee von Weizsäcker
geb. Grassmann
aus München 1968



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatte: Prof. Dr. W. Stich

Dekan: Prof. Dr. E. Kraft

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 4. 1970

Die im Text erwähnten Abbildungen können in der
Originalarbeit oder in "BLUT", Bd. XVIII, Heft 4,
1970 eingesehen werden.

DARSTELLUNG DER ERYTHROZYTENMEMBRAN MIT DER GEFRIERÄTZTECHNIK.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Erythrozyten und Erythrozytenschatten, nach hypotoner Hämolyse und nach Saponineinwirkung.

I. Einleitung

Zahlreiche Untersuchungen wurden über Funktion und Aufbau der Erythrozytenmembran gemacht. Einerseits diente sie als leicht zugängliches Objekt, um mit Methoden der Biochemie, Biophysik und Morphologie Grundkenntnisse zu erlangen, aus denen sich allgemeine Modellvorstellungen über den Aufbau einer Zellmembran entwickeln ließen. Als einer der grundlegenden Versuche sei nur der von Gorter und Grendel (11) erwähnt, die feststellten, daß die quantitativ extrahierten und auf einer Wasseroberfläche unimolekular ausgebreiteten Lipide der Erythrozytenmembran das Doppelte der Erythrozytenoberfläche bedeckten, und daraus folgerten, daß die Membran als eine Doppelschicht von Lipiden vorliegen müsse.

Weitere Untersuchungen führten dann zu dem Doppelschicht (bi-molecular leaflet) - Modell von Danielli und Davson (7), das - obwohl in seiner Grundkonzeption viel zu einfach - doch wegweisend für die weitere experimentelle und theoretische Erforschung der biologischen Membran wurde, und auch heute noch - wenn auch weitgehend modifiziert - Gültigkeit besitzt (25, 48, 39).

Darüberhinaus erweckt die Erythrozytenmembran vom klinischen Standpunkt aus besonderes Interesse, seitdem bei fast allen Erkrankungen der Erythrozyten primäre oder sekundäre Veränderungen an der Membran diskutiert werden (29, 28, 35). Derartige Membrandefekte können der elektronen-mikroskopischen Betrachtung zugänglich sein. So wurden Veränderungen in der Feinstruktur der Erythrozytenmembran bei einer Reihe von Erkrankungen gefunden, die zu der Gruppe der korpuskulären hämolytischen Anämien gehören: Hoffmann und Mitarbeiter (17) zeigten bei Thalassämia Major bestimmte granuläre Veränderungen an der Erythrozytenoberfläche. Lewis (27) fand bei Paroxysmaler Nächtlicher Hämoglobinurie

Eindellungen und unregelmäßig angeordnetes elektronendichtes Material - Befunde, die zwar nicht unwidersprochen blieben (22), aber doch Anlaß für weitere Untersuchungen sind.

Von noch größerer Bedeutung sind aber heute die Vorgänge, die sich zwischen Erythrozyt und seiner Umgebung abspielen, so die Antigen-Antikörperreaktionen, die Adsorption und Reaktion von Mikroorganismen mit spezifischen und unspezifischen Rezeptorsystemen (12, 52), der Angriff direkt hämolysierender Toxine. Auch bei dysproteinämischen Zuständen nimmt man heute an, daß sie zu spezifischen Membranänderungen führen, die einen vorzeitigen Abbau der Erythrozyten verursachen (35, 34).

Alle diese Vorgänge spielen sich unmittelbar an oder innerhalb der Membran der Erythrozyten ab. Für die morphologische Untersuchung bedeutet es allerdings eine Schwierigkeit, daß die Präparation für die elektronenmikroskopische Untersuchung durch die Entwässerung, Fixierung und Färbung zu eingreifenden und noch wenig exakt bekannten (40, 26) Denaturierungen führt.

Mit der Gefrierätzung, die von H. Moor (31) nach einer Idee von R. L. Steere (47) entwickelt wurde, steht uns jedoch heute eine ergänzende Methode zur Verfügung, die es erlaubt, die Abdrücke von lebend eingefrorenen und im Vakuum aufgebrochenen und Kohle-Platin-beschatteten Zellen elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Mit dieser Präparationsmethode werden die Artefakte der Dünnschnitt-Präparation vermieden. Außerdem verlaufen die Bruchflächen häufig entlang - oder wie einige Untersucher meinen (5, 46): innerhalb - der natürlichen Membranen von Zellen und Zellorganellen, so daß ein sehr anschauliches dreidimensionales Bild der Zelloberflächen entsteht. Die Gefrierätztechnik eröffnete daher neue Möglichkeiten in der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Membranoberflächen.

Dabei fanden sich überraschenderweise an den verschiedensten pflanzlichen und tierischen Membranen sphärische Partikel, deren Natur noch unklar ist (31, 33, 42). Auch an Erythrozyten zeigten sich in verschiedenen Untersuchungen solche Partikel (51, 49, 24).

Bevor die Gefrierätztechnik am Erythrozyten bei Erkrankungen und unter komplizierten Versuchsbedingungen anzuwenden ist, müssen jedoch zunächst verschiedene Fragen beantwortet werden:

Wie stellt sich die normale Erythrozytenmembran mit dieser neuen Technik dar?

Lassen sich durch mehrmaliges Waschen der Erythrozyten in physiologischer Pufferlösung Veränderungen erzielen? Handelt es sich etwa bei den an der Zellmembran festzustellenden Partikeln um lose anhaftende Verunreinigungen, die durch derartige Maßnahmen zu entfernen sind?

Verursacht eine schonende, stufenweise Hämolyse in hypotonem Phosphatpuffer spezifische feinstrukturelle Veränderungen an der Membran, so daß sich elektronenmikroskopisch erkennbare Unterschiede im Vergleich zu den Membranen unbehandelter roter Blutkörperchen ergeben?

Schließlich, führt die Behandlung von intakten Erythrozyten oder von Erythrozytenschatten mit Saponin zu besonderen Membrandefekten?

Ziel unserer Versuche war es also, mit einer neuen Präparationstechnik die Feinstruktur der unbehandelten sowie der experimentell veränderten Erythrozytenmembran zu untersuchen, um hieraus möglicherweise neue Einsichten in den Aufbau der Zellmembran und eine Grundlage für das Studium krankhaft veränderter Membranen zu gewinnen.

II. Material und Methode

A. Material:

Venöses Blut gesunder Spender im Alter von 24 bis 38 Jahren.

B. Präparation bis zur Gefrierätzung:

1. Nativblut: Direkt aus der Fingerkuppe ohne Zusatz von Koagulantien oder Frostschutzmitteln.

Zahl der Versuche: 2

Zahl der Ätzungen: 4

2. Ungewaschene Erythrozyten unter Zusatz von Antikoagulantien und Glycerin als Frostschutzmittel (45, 38, 31, 13):

Venöses Blut wurde mit Heparin oder mit ACD-Lösung A (Natr. citr. 2,55 %; Acid. citric. 0,8 %; Dextrose 1,2 %), die im Verhältnis 1 : 4 zugesetzt wurde, ungerinnbar gemacht, und schrittweise Glycerin bis 20 Vol. % zugesetzt.

Zahl der Versuche: 4

Zahl der Ätzungen: 8

3. Gewaschene Erythrozyten:

5 ml ACD-Blut wurde 20 Minuten bei 1000 g und 4°C zentrifugiert, die absedimentierten Erythrozyten wurden dreimal in Ringer-Lösung oder in isotonem Na-Phosphatpuffer (0,155 M; 310 mOsm; pH 7,4) gewaschen, dazwischen je 10 Minuten bei 1000 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend schrittweise Zusatz von Glycerin bis 20 Vol. %.

Zahl der Versuche: 2

Zahl der Ätzungen: 2

4. Erythrozytenschatten:

10 ml ACD-Blut wurden zentrifugiert (20 Minuten, 1000 g, 4°C), der Plasmaüberstand einschließlich der Leukozytenschicht abgehoben und das Erythrozytensediment dreimal in isotonem Na-Phosphatpuffer gewaschen, dazwischen wurde jeweils 10 Minuten bei 1000 g und 4°C zentrifugiert. Zur Hämolyse wurden ca. 2 ml gewaschenes Erythrozytenkonzentrat mit hypotonem Na-Phosphatpuffer (20 mOsm, pH 7,4) auf 50 ml aufgefüllt und nach 30-minütiger Einwir-

kung zentrifugiert (30 Minuten bei 20 000 g und 4°C in einer MSE-HS-18-Zentrifuge). Der Überstand wurde abgegossen und der Vorgang dreimal wiederholt (8). Der letzte Überstand wurde spektralphotometrisch (Unicam Sp 800) auf noch vorhandenes Hämoglobin überprüft.

Die so gewonnenen Erythrozytenschatten wurden je 30 Minuten mit 25 %, sodann mit 50 % Glycerin in hypotonem Phosphatpuffer incubiert bei 4°C. Dazwischen und zum Schluß wurde 30 Minuten bei 38 000 g und 4°C zentrifugiert.

Zahl der Versuche: 5

Zahl der Ätzungen: 24

5. Saponinbehandlung:

a. von nichthämolysierten, gewaschenen Erythrozyten:

10 ml ACD-Blut wurden zentrifugiert (30 Minuten, 1000 g, 4°C) und dreimal in isotonem Na-Phosphatpuffer gewaschen. Die Hämolysen erfolgte mit 0,05 % Saponinlösung (9) ("Saponin aus Roßkastanien", Fa. Carl Roth OHG) in isotonem Phosphatpuffer 30 Minuten lang bei 4°C. Darauf wurde zentrifugiert (30 Minuten bei 38 000 g und 4°C in einer MSE-HS-18-Zentrifuge) und noch zweimal mit isotonem Phosphatpuffer nachgewaschen (dazwischen jeweils Zentrifugation 30 Minuten bei 38 000 g und 4°C). Der letzte Überstand wurde wiederum spektralphotometrisch auf den Hb-Gehalt untersucht. Glycerin wurde stufenweise bis zu einer Endkonzentration von 30 Vol.% hinzugegeben.

Zahl der Versuche: 4

Zahl der Ätzungen: 18

b. von Erythrozytenschatten:

Erythrozytenschatten wurden nach der oben angegebenen Methode hergestellt und anschließend das Sediment mit einer 0,05 % Saponinlösung in hypotonem Na-Phosphatpuffer wieder aufgeschwemmt. Nach 30 Minuten Einwirkungszeit bei 4°C wurde zentrifugiert (30 Minuten bei 38 000 g und 4°C) und der Überstand spektralphotometrisch gemessen. Das Sediment wurde noch zweimal mit hypotonem Phosphatpuffer gewaschen, dazwischen jeweils 30 Minuten bei 38 000 g und 4°C zentrifugiert. Der letzte Überstand wurde ebenfalls spektralphotometrisch auf den Hämoglobingehalt geprüft. Der Glyce-

rinzusatz erfolgte stufenweise bis zu einer Konzentration von 30 Vol. %.

Zahl der Versuche: 4

Zahl der Ätzungen: 18

C. Gefrierätzung:

Das Sediment wurde zunächst in einigen Tropfen der Glycerinlösung resuspendiert, um eine zu enge Packung der Schatten zu vermeiden.

Mit einer Glaskapillare wurden dann einzelne Tropfen des Sediments auf Kupferobjektträger übertragen, sofort in Freon 22 (-160°C) eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Die Ätzung und Bedampfung erfolgte in der Gefrierätzanlage der Firma Balzers. Die Präparate wurden im Hochvakuum bei -100°C geschnitten, 60 Sekunden geätzt und mit Platin-Kohle (Winkel 45°) und Kohle (senkrecht zum Objektträger) beschattet (31, 3).

Die Platin-Kohle-Abdrücke wurden auf destilliertem Wasser von den Präparaten gelöst und anschließend durch Schwefelsäure, Eau de Javelle und mehrstündiges Wässern gereinigt.

Zum Schluß wurden die Abdrücke auf Formvar-befilmte Kupfernetze übertragen und im Siemens-Elmiskop IA untersucht.

III. Ergebnisse

1. Erythrozytenschatten:

Da die Versuche mit intakten Erythrozyten bis auf die Veränderung des Zellinhaltes (s. u.) keine morphologischen Unterschiede gegenüber den durch hypotone Hämolyse gewonnenen Erythrozytenschatten aufwiesen, werden sie im folgenden nicht getrennt behandelt.

a. Inneres der Erythrozyten:

Ein großer Teil der Erythrozytenschatten (Abb. 2) zeigt, soweit sie quer geschnitten sind, annähernd die bekannte bikonkave Form nativer Erythrozyten. Die Grundsubstanz inner- und außerhalb der Schatten erweist sich als identisch und zeigt eine feingranuläre Struktur mit oft rosetten- oder fächerförmig angeordneten Kristallen, die keine sichtbaren Abdrücke auf den Membranen hinterlassen (Abb. 2 - 5). Nur in den nicht-hämolysierten Erythrozyten besteht das Zellinnere aus dichtgepackten, häufig kettenförmig angeordneten Granula, deren Größe von 80 - 100 A ungefähr der des Abdrucks eines Hämoglobinmoleküls (50, 37) entsprechen würde (Abb. 1). Im Zellinneren werden keine Strukturen gefunden, die auf ein nach der Hämolyse zurückbleibendes Gerüststroma schließen lassen. Auch zeigen sich keine kontinuierlichen Übergänge, etwa in Form von Fibrillen, zwischen Innenseite der Membran und Zellinnerem. Vereinzelt finden sich Zytosomen mit glatter Membran (Abb. 3).

b. Erythrozytenmembran:

Die Bruchebene verläuft häufig entlang der inneren oder äußeren Oberfläche der Zellen. Dabei zeigt die Membran an der Außen- und Innenseite eine homogene Grundsubstanz, die sich bei stärkerer Vergrößerung als sehr fein granuliert oder feinnetzig gezeichnet erweist (Abb. 4, 5). Defekte in der Größenordnung, wie sie der Durchtritt des Hämoglobins erfordern würde, konnten wir bei dieser Versuchsanordnung niemals finden. Auch soweit die Membranen quer gebrochen sind, zeigen sie eine durchgehende Kontur von gleichmäßiger Dicke (Abb. 3). Alle Membranen sind mit Partikeln bedeckt.

Dabei fällt auf, daß die Außenseite der Membran wesentlich dichter mit diesen Partikeln besetzt ist als die Innenseite (Abb. 2 - 5). Auf beiden Seiten ist die Verteilung unregelmäßig, außen liegen die Partikel mehr in dichten Haufen oder auch kettenförmig zusammen, so daß dazwischen unregelmäßig begrenzte Felder frei bleiben (Abb. 4). Der Durchmesser der Partikel schwankt zwischen 50 bis 120 A bei unserer Technik, wobei die Dicke der Aufdampfschicht etwa 20 A beträgt (30).

Ihre Form ist annähernd halbkugelig, wie sich aus dem stumpf zulaufenden Schatten ergibt. Manchmal findet sich eine zentrale Eindellung, auch zeigen nicht alle Partikel die Form einer halbprominenten Kugel, sondern erscheinen oval oder langgestreckt. Dabei könnte es sich allerdings auch um zwei oder mehrere eng aneinandergelagerte Partikel handeln, die wir mit unserer Technik nicht mehr unterscheiden können.

Vertiefungen in der Membran, die durch ein Herausbrechen der Partikel entstanden sein könnten, fanden wir nicht. Wir fanden auch keine "Negativabdrücke" der Membranen, wie man sie durch ein Wegbrechen der Membran vom umgebenden wasserhaltigen Medium erwarten würde.

2. Effekte der Saponinbehandlung an Erythrozyten und Erythrozytenschatten:

- a. Schon bei der Präparation fällt auf, daß durch die Saponinbehandlung das Hämoglobin wesentlich rascher und stärker aus den Erythrozyten entfernt wurde als durch Behandlung mit hypotoner Lösung (43). Spektralphotometrische Untersuchungen ergaben, daß auch Erythrozytenschatten, bei denen nach wiederholtem Waschen mit hypotonem Puffer nur noch ein geringer Hämoglobingehalt in der Waschflüssigkeit gemessen werden konnte, noch eine deutlich meßbare Hämoglobinmenge abgeben, wenn man sie anschließend mit Saponin behandelt. Dabei entfärbt sich das Sediment total (Abb. 14).
- b. Die Membranoberfläche erweist sich als in ihrer Grundstruktur nicht verschieden von derjenigen der oben beschriebenen Erythrozytenschatten. Auch die Partikel finden sich wieder in der gleichen Größe, Anordnung und Verteilung auf der Innen- und Außenseite der Membran (Abb. 6). Daneben zeigen sich aber überraschende und sehr auffällige Veränderungen:

Bereits auf Übersichten (Abb. 10) fallen die häufigen Brüche in den quergetroffenen Membranen auf, im Gegensatz zu den glatten, kontinuierlichen Linien der nicht mit Saponin behandelten Erythrozytenschatten. Bei genauerer Inspektion finden sich an diesen Stellen blasenförmige Membranausstülpungen, die ebenfalls im Querschnitt besonders gut zu sehen sind (Abb. 7, 8). Daß es sich bei diesen Ausstülpungen um Teile der Membran handelt, ist deutlich zu erkennen (Abb. 7).

Auf den freigebrochenen Membranoberflächen zeigen sich annähernd runde Löcher, deren Größe im Bereich von ca. 100 A bis 1200 A liegt. Sie wirken teilweise wie ausgestanzt und lassen die Grundsubstanz inner- oder außerhalb der Zelle durch die Membran hindurch erkennen. Es läßt sich daraus wohl annehmen, daß an diesen Stellen die bereits beschriebenen Ausstülpungen beim Schneidevorgang weggebrochen worden sind.

Daneben finden sich Veränderungen, die wie ein Vorstadium aussehen: Mehrere, unregelmäßig begrenzte Vertiefungen nebeneinander, auch einzelne Löcher in der Größe der Partikel (Abb. 9). Die Störungen der Membran lassen keine bestimmte Ordnung, etwa in Form eines gleichmäßig über die Membran verteilten Defektmusters, erkennen und sind von Versuch zu Versuch, auch von Zelle zu Zelle zwar nicht qualitativ, aber quantitativ verschieden.

- c. Nach Saponinbehandlung nichthämolyasierter, gewaschener Erythrozyten zeigte sich in einem Versuch ein besonderer Befund (Abb. 12, 13): Die Membran zeigt ein durchgehendes hexagonales Muster, das besonders an der Innenseite von überraschender Regelmäßigkeit ist, während es an der Außenseite weniger deutlich hervortritt. Der Durchmesser der Sechsecke beträgt ca. 100 A, der Abstand zwischen den Mittelpunkten zweier benachbarter Sechsecke ist ca. 140 A, und sie sind jeweils von einer etwa 30 A breiten Vertiefung umgeben. Die beschriebenen Strukturen wurden nur in einem Präparat beobachtet und waren bei weiteren Versuchen nicht zu reproduzieren.

IV. Diskussion:

A. Methode

Die Gefrierätzung bietet an sich eine optimale Möglichkeit zur Darstellung lebenden Materials. Moor (31) zeigte in Abhängigkeit von der Gefriereschwindigkeit und der Konzentration des Frostschutzmittels die Überlebensrate von Hefezellen, die unter den Bedingungen der Gefrierätzung etwa 90 % betrug. Man kann daher annehmen, daß eine sehr weitgehende Freiheit von Artefakten gewährleistet ist. Eine mögliche Beeinträchtigung der natürlichen Strukturen durch das Frostschutzmittel in Form von Plasmolyse oder eine Depression der Atmung wurde zwar bei anderen Zellarten beschrieben (31), wir sahen jedoch bei den von uns angewendeten Glycerinkonzentrationen auch nach langer Inkubationszeit niemals Hämolyse, die ein sicherer Indikator für eine Membranstörung gewesen wäre. Versuche ohne Glycerinzusatz, die allerdings durch die starke Kristallbildung schwer zu deuten waren, ergaben keinen morphologisch unterschiedlichen Aspekt der Membran.

Die Interpretation der erhaltenen Bilder ist dadurch schwierig, daß verschiedene Auffassungen über den Verlauf der Bruchflächen herrschen. Branton (5) ist der Meinung, daß während des Schneidevorganges die Bruchlinien nicht entlang der Oberfläche, sondern innerhalb der Membran verlaufen (membrane splitting). Wir sind jedoch eher der Auffassung, daß es sich bei dem von ihm angeführten und auch bei uns gut zu erkennenden "basalen Rand" (Abb. 1, 10) nicht um eine Membranschicht handelt, sondern daß er durch den Übergang zwischen Medium und Membranoberfläche hervorgerufen wird.

Auch läßt sich unserer Meinung nach die Dicke der Membran bei der Gefrierätzung nicht ohne weiteres exakt bestimmen, da man den genauen Einfallswinkel von der Bedampfungsquelle zur Membran kennen müßte.

Stähelin (46) beschrieb an künstlichen Lipoidmembranen, wie auch an Zellmembranen von Algen, Bakterien und Entenembryonen große Plaques und hält daher

das Aufbrechen der Membran für möglich. Wir sahen jedoch niemals an den Erythrozyten entsprechende Plaques, und fanden auch keine Zellränder, die eindeutig erkennbar stufenförmig gebrochen waren.

Wir sind daher mehr der Auffassung von H. Moor, J. Koehler und C. Ruska (32, 24, 42) und halten die freigelegten Bruchflächen für die äußeren bzw. inneren Oberflächen der Membran. Endgültig ließe sich diese Frage wohl allerdings erst klären, wenn es gelänge, die Oberflächen bei der Präparation spezifisch zu kennzeichnen, etwa durch Beladen mit Substanzen von charakteristischer Form.

B. Ghosts

Bei der von uns verwendeten Präparationsmethode lassen sich weitgehend hämoglobinfreie Erythrozytenschatten (ghosts) ohne Verlust von Membranlipiden herstellen (8). Dementsprechend zeigen die so gewonnenen Erythrozytenschatten im Dünnschnitt auch den charakteristischen dreischichtigen Aufbau. Untersuchungen des Membranstoffwechsels - gemessen am Kalium - und Natriumtransport - ergaben, daß dieser sich nicht wesentlich von dem intakter Erythrozyten unterscheidet (16), so daß sich die morphologischen Befunde an Erythrozytenschatten wohl ohne Einschränkung auf die Membran unbehandelter Erythrozyten übertragen lassen.

Mit Hilfe von Fe^{59} -Hämoglobin (15), Ferritin und kolloidalem Gold (44) ließ sich feststellen, daß bei hypotoner Hämolyse die Membran nur eine ganz kurze Zeit - etwa 15 bis 30 Sekunden nach Beginn der Hämolyse - durchlässig für Teilchen dieser Größenordnung und damit auch für Hämoglobin ist. Dem entsprechen auch unsere Befunde, die keinerlei Defekte in der Membran zeigen (1) (Abb. 1 - 4).

Die Partikel an der Erythrozytenmembran wurden mit der Gefrierätzmethode in verschiedenen Untersuchungen festgestellt (23, 51, 24, 49). Auch an anderen Zellarten und an den Membranen der Zellorganellen finden sich solche Partikel (31, 42, 33, 6).

Über die Natur und Funktion dieser Partikel läßt sich bis jetzt noch wenig aus-

sagen. Fest steht nur, daß sie sich weder durch ausgedehntes Waschen in isotonen Pufferlösungen, noch durch osmotische Hämolyse oder durch Saponinbehandlung entfernen oder auch nur vermindern lassen. Es erscheint daher unwahrscheinlich, daß es sich um Verunreinigungen, z. B. um bei der Hämolyse freigesetztes Hämoglobin, handelt. Es könnte sich um Gamma-Globuline handeln, deren Vorhandensein an der Erythrozytenoberfläche erst in neueren Untersuchungen nachgewiesen wurde (34, 12). Die Frage, ob es sich bei diesen Partikeln etwa um sessile Antikörper oder um andere spezifische Rezeptoren der Membran handelt, muß offen bleiben, wird aber für weitere Untersuchungen von größtem Interesse sein.

C. Saponinbehandlung

Man weiß heute durch verschiedene Untersuchungen an Lipidmembranen in wässrigem Medium, daß sich ein äquimolekularer Komplex zwischen Cholesterin und Saponin bildet (10, 19). Nach wie vor ist aber die Wirkungsweise des Saponins auf biologische Membranen nicht genau geklärt (43). Untersuchungen an negativ-kontrastierten Membranen von Viren und Erythrozytenschatten, die mit Saponin behandelt worden waren, zeigten Vertiefungen von 80 - 100 Å Durchmesser in hexagonaler Anordnung (9). Dieser auffallende Befund führte zunächst zu der naheliegenden Annahme, daß durch das Saponin Lipide aus der Membran herausgelöst würden und nur noch ein Maschenwerk von Protein übrig bliebe, entsprechend dem von Parpart und Ballantine vorgeschlagenem "Mosaikmodell" der Membran (52, 36). Einige Untersucher sahen auch in der auf die Komplexbildung mit den Saponinmolekülen folgende Umstrukturierung der Membranlipide und dem damit einhergehenden Verlust der selektiven Permeabilität der Membran den eigentlichen Grundvorgang der Saponinhämolyse (10).

Weitere Untersuchungen ergaben jedoch, daß es sich bei diesem hexagonalen Muster zumindest nicht um die "Demaskierung" einer ursprünglich vorhandenen Membranstruktur handeln könne, sondern wohl eher um Artefaktbildungen, die durch vorübergehende Komplexbildung zwischen dem Saponin und Oberflächensubstanzen, bzw. Saponin und Cholesterin hervorgerufen würden (4, 18). Es zeigte

sich auch, daß reine Lipide in Wasser solche Muster hervorrufen konnten (42). Auch wir sahen in einem Versuch solche auffallend regelmäßigen hexagonalen Muster in der gleichen Größenordnung (Abb. 12, 13). Sie ließen sich jedoch nicht reproduzieren. Es dürfte sich daher um eine sehr flüchtige, Saponin-bedingte Veränderung der Erythrozytenmembran handeln, möglicherweise um eine Saponin-bedingte Umgruppierung der Lipid-Moleküle; die nachgewiesenen Vertiefungen wären dann nur scheinbar, d. h. sie wären erst während der Ätzung durch Sublimation der ringförmig angeordneten Wassermoleküle entstanden. Die Funktion der beschriebenen "Vertiefungen" bei der eigentlichen Hämolyse, d. h. beim Hämoglobin-Durchtritt durch die Membranen, ist jedenfalls fraglich. Alle unsere Versuche mit Saponin ergaben dagegen die oben beschriebenen deutlichen Defekte an der Membran (Abb. 7 - 11). Daß es sich dabei nicht um reversible Änderungen handelt, wie bei der hypotonen Hämolyse, stimmt mit den Beobachtungen von Seeman (44) überein. Interessant sind für uns in diesem Zusammenhang auch die Vorstellungen von Jung (21, 20), der den Wirkungsmechanismus von oberflächenaktiven Substanzen im direkten "feldförmigen", d. h. eine Mindestfläche bedeckenden Angriff des Lysins an der Membran sieht. Freilich können wir auf Grund unserer Untersuchungen nicht sagen, ob es sich bei den von uns beobachteten Defekten um solche primären, spezifisch durch das Saponin hervorgerufenen Änderungen oder um ein sekundäres Aufplatzen bzw. Vorwölben der Membran handelt, dem ein Stadium der diffusen molekularen Umstrukturierung und Verlust der selektiven Membranpermeabilität vorangegangen ist.

V. Zusammenfassung

Durch hypotone Hämolyse gewonnene Erythrozytenschatten wurden nach Gefrierätzung elektronenmikroskopisch untersucht. Die Membranoberfläche zeigt keine Felderung oder stufenförmig gebrochene Ränder. Es wird daher angenommen, daß die Bruchlinie entlang den inneren und äußeren Oberflächen der Membran verläuft. An den Membranen finden sich Partikel in der Größe von 50 bis 150 Å, die sich weder durch Waschen, noch durch hypotone Hämolyse oder Saponinbehandlung entfernen lassen, so daß die Möglichkeit, daß es sich bei diesen Partikeln um Träger spezifischer Funktionen handelt, in Betracht gezogen wird.

Die Saponinbehandlung solcher Erythrozytenschatten oder intakter Erythrozyten führt zu auffallenden Veränderungen an der Membran, die eventuelle Rückschlüsse auf den durch Saponin bewirkten Hämolysemachanismus zulassen.

LITERATUR

1. ADAMS, C. D.: The Ultrastructure of the Human Red Cell Ghost.
Anat. Rec. 136:151 (1960)
2. BAKER, R. F.: Ultrastructure of the Red Blood Cell.
Fed. Proc. 26:1785-1801 (1967)
3. BALZERS, A. G. (hrsg.): Gefrierätzung, Elektronenmikroskopische Präparationstechnik.
4. BANGHAM, A. D., Action of Saponin on Biological Cell Membranes.
HORNE, R. W.: Nature 196:952 (1962)
5. BRANTON, D.: Fracture Faces of Frozen Membranes. Proc. nat.
Acad. Sci (Wash) 55:1048-1056 (1966)
6. BRANTON, D., Fine Structure in Freeze-Etched Allium cepa L. Root
MOOR, H.: Tips. J. Ultrastruct. Res. 11:401-411 (1964)
7. DAVSON, H.: Growth on the Concept of the Paucimolecular Membrane.
Circulation 26 (1962)
8. DODGE, J. T., The Preparation and Chemical Characteristics of
MITCHELL, C., Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes:
HANAHAN, D. J.: Arch. Biochem. 100:119 (1963)
9. DOURMASHKIN, R. R., Electron Microscopic Observations on Rous Sarcoma
DOUGHERTY, R. M., Virus and Cell Membranes. Nature 194:1116 (1962)
HARRIS, R. J. C.:

10. GLAUERT, A. M., Action of Saponin on Biological Cell Membranes.
DINGLE, J. T. Nature 196:952 (1962)
LUCY, J. A.:
11. GORTER, E., On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes
GRENDEL, F.: of the Blood. J. Exp. Med. 41:439 (1925)
12. GRAMLICH, F.: Die Rezeptorfunktion der Erythrocyten. S. Karger
Basel/New York (1966)
13. GREIFF, D., Cryotolerance of Selected Sites on the Surfaces of
SEIFERT, P.: Membranes of Cells. Cryobiology V. 4, No. 6 (1968)
14. HENNEMANN, H. H.: Antikörperbeladung und Erythrocytenoberfläche.
Folia haemat. Neue Folge 6:430 (1962)
15. HOFFMANN J. F.: Physiological Characteristics of Human Red Blood
Cell Ghosts. J. Gen. Physiol. 42:9 (1958)
16. HOFFMANN, J. F.: The Active Transport of Na by Red Blood Cell Ghosts.
J. Gen. Physiol. 45:837 (1962)
17. HOFFMANN, J. F., Ultrastructure of Erythrocyte Membranes in Thalassemia
WOLMAN, I. J., Major and Minor. Blood 11:946 (1956)
HILLIER, J.,
PARPART, A. K.:
18. HUSSON, F., Structure of Red Cell Ghosts and the Effect of
LUZZATI V.: Saponin Treatment. Nature 197:822 (1963)
19. JOOS, P.: Interaction between Cholesterol and other Biological
Surfactants at Interface. Arch. Int. Physiol. 75:562-3
(1967)

20. JUNG, F.: Hämolyse durch Netzmittel. 7. Freiburger Symposion (1959)
21. JUNG, F., Über die Saponinhämolyse. III. Mitteilung. NAUNYN-SCHWARZKOPFF, J.: Schmiedebergs Arch. exp., Path. Pharmac. 215:556-567 (1952)
22. KANN, H. E., Production of In Vitro Lytic Characteristics of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Erythrocytes in MENGEL, C. E., MERIWETHER, W. H. Normal Erythrocytes. Blood Vol. 32, No. 1 (1968) EBBERT, L.:
23. KOEHLER, J. A.: A Cell Membrane Associated Specialisation of Nucleated Erythrocytes as Revealed by Freeze Etching. J. of Cell Biology V. 35, No. 2, 71A (1967)
24. KOEHLER J. K.: Freeze-etching Observations on Nucleated Erythrocytes with Special Reference to the Nuclear and Plasma Membranes. Ztschr. f. Zellforschung u. mikroskop. Anatomie V. 45,1 (1968)
25. KORN, E. D.: Structure of Biological Membranes. Science 153: 1491-98 (1966)
26. LENARD, J., Alteration of the Conformation of Proteins in Red Blood Cell Membranes and in Solution by Fixative SINGER, S. J.: Used in Electron Microscopy. J. Cell Biology Vol. 37, No. 1, 117-121 (1968)
27. LEWIS, S. M., Electronmicroscopic Studies of the Red Cell in DANON, D., Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. Brit. J. Haematol. V. 11, Nr. 6 (1965) MARIKOVSKY, Y.:

28. MARTI, H. R.: Die Erythrozytenmembran. Schweizer. Mediz. Wochenschrift Bd. 98 (1968)
29. MOHRING, D.: Die Funktion der erythrozytären Membran. Folia haemat. Bd. 9:296-316 (1964)
30. MOOR, H.: Platin-Kohle-Abdruck-Technik angewandt auf den Feinbau der Milchröhren. J. Ultrastruct. Res. 2:393-422 (1959)
31. MOOR, H.: Die Gefrierfixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie. Zeitschr. f. Zellf. 62:546-580 (1964)
32. MOOR, H.: Durchführung der Gefrierätzung und Interpretation der Resultate betreffend Oberflächenstrukturen von Membranen und Feinbau von Mikrotubuli und Spindelfasern. Balzers Fachbericht Nr. 9:1-11 (1967)
33. MOOR, H.,
RUSKA, C.,
RUSKA, H.: Elektronenmikroskopische Darstellung tierischer Zellen mit der Gefrierätztechnik, Zeitschr. f. Zellf. 62:581-601 (1964)
34. MÜLLER, H. E.,
GRAMLICH, F.: Über den Plasmaproteinfilm an der Oberfläche menschlicher Erythrozyten. Acta haematol. 34:239 (1965)
35. NEERHOUT, R. C.: Disorders of the Red Cell Membranes: a review of biochemical and physiologic alterations of erythrocyte membranes which may lead to morphologic changes and shortened cell survival. Clin. Pediat. (Phila.) 7:451-64 (1968)

36. PARPART, A. K., Molecular Anatomy of the Red Cell Plasma Membrane.
BALLANTINE, R.: In: Modern Trends in Physiology and Biochemistry.
Academ. Press, New York (1952)
37. PERUTZ, M. F., Structure of Hemoglobin. Nature 185:416 (1960)
ROSSMANN, M. G.,
CULLIS, A. F.,
MUIRHEAD, H.,
WILL, G.:
38. PORTERFIELD, J. S., Preservation of Cells in Tissue Culture by Glycerol
ASHWOOD-SMITH, and Dimethyl Sulfoxyde. Nature 193:548 (1962)
M. J.:
39. RAND, R. P.: X-ray Diffraction Study in Water of Lipids Extracted
from Human Erythrocytes: the position of cholesterol
in the lipid lamellae. Biophys. J. 8:125-37 (1968)
40. REIMER, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präpara-
tionsmethoden. 2. Aufl. Springer (1967)
41. ROSENBERG, D. M.: Elektronenoptische Studie der Erythrozytenoberfläche
mit Hinsicht auf ihre Fähigkeit der Virusabsorption.
Folia haematol. 77:163 (1960)
42. RUSKA, C., Elektronenmikroskopische Darstellung von Thrombozyten
SCHULZ, H.: mit der Gefrierätztechnik. Klin. Wschr. 46. Jhrg.,
Heft 13 (1968)
43. SCHUBOTHE, H. Hämolyse und Hämolytische Erkrankungen.
(Hrsg.): 7. Freiburger Symposion. Springer (1961)
44. SEEMAN, P.: Transient Holes in the Erythrocyte Membrane during
Hypotonic Hemolysis and Stable Holes in the Membrane
after Lysis by Saponin and Lysolecithin. J. Cell
Biology Vol. 32. No. 1 (1967)

44. SEEMAN, P.: Transient Holes in the Erythrocyte Membrane during Hypotonic Hemolysis and Stable Holes in the Membrane after Lysis by Saponin and Lysolecithin. *J. Cell Biology* Vol. 32, No. 1 (1967)
45. SMITH, A. U.: The Action of Glycerol and Related Substances. In: R. J. C. Harris (Hrsgr.): Biological applications of freezing and drying. N.Y. Acad. Press p. 31-32 (1954)
46. STAEHELIN, A.: The Interpretation of Freeze Etched Artificial and Biological Membranes. *Ultrastruct. Res.* 22:326-347 (1968)
47. STEERE, R. L.: Electron Microscopy of Structural Detail in Frozen Biological Specimens. *J. Biophys. and Biochem. Cytol.* 3:45 (1957)
48. THREADGOLD, L. T.: The Ultrastructure of the Animal Cell. Pergamon Press, 1. Aufl. (1967)
49. WEINSTEIN, R. S., Ultrastructure of Freeze Cleaved and -Etched Red
KOO, V. M.: Cell Membranes and Isolated Red Cell Ghosts Prepared by Gradual Osmotic Lysis. *J. Cell Biology* Vol. 35, No. 2, 190 A (1967)
50. WEINSTEIN, R. S., Periodicity in the Cytoplasm of Freeze-Cleaved Sheep
MERK, F. B.: Erythrocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125:38-40 (1967)
51. WEINSTEIN, R. S., The Freeze-Cleave Approach to the Ultrastructure of
SOMEDA, K.: Frozen Tissues. *Cryobiology* Vol. 4, No. 3 (1967)

52. WINTZER, G., Topochemische Anordnung von Gangliosiden in der
 UHLENBRUCK, G.: Erythrozytenmembran. Z. Immunitätsforschung
 133:60-67 (1967)

Lebenslauf

Ich wurde am 25. März 1944 als älteste Tochter des Internisten Dr. Winfried Graßmann und seiner Frau Lieselotte, geb. von Zerboni di Sposetti in Bayrischzell geboren. In München besuchte ich die Volksschule, ab 1954 das Realgymnasium und ab 1959 das Humanistische Gymnasium an der Luisenstraße, an dem ich 1963 das Abitur ablegte. Im Herbst 1963 begann ich mit dem Medizinstudium in Freiburg, nach dem Physikum ging ich für ein Semester nach Hamburg. Seit 1967 studiere ich in München und möchte hier nach dem Sommersemester 1969 das Staatsexamen ablegen.

